



**Alexandra Cristina  
Pacheco Pinto**

**Polimorfismos do Oxido Nítrico Sintetase e Doença  
Coronária**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Dr. António Correia, Professor associado com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho aos meus pais

## **O júri**

### **Presidente**

Professora. Doutora Maria Paula Polónia Gonçalves, professora associada da Universidade de Aveiro

### **Vogais:**

Professor. Doutor António Carlos Matias Correia, professor associado com agregação da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Susana Magadán Mompó, professora adjunta do Instituto de Superior de Saúde de Alto Ave.

Doutora Anabela de Oliveira Pereira, investigadora do CESAM, Universidade de Aveiro

## **Agradecimentos**

Teria sido muito difícil a realização deste trabalho, sem a colaboração das pessoas que a diferentes níveis me apoiaram. Por essa razão não posso deixar de salientar o agradecimento a todos aqueles que me ajudaram durante a sua realização, onde se destacam:

À minha orientadora, Dra Susana Magadán, pela sua constante disponibilidade, orientação, e companheirismo.

À Dra Dianne Catalão pela sua amizade, disponibilidade e ajuda sempre presente.

Ao Dr António Correia, pela sua compreensão, apoio e incentivo.

Ao serviço de Cardiologia do Centro Hospitalar do Alto Ave EPE.

Ao Instituto de Superior de Saúde de Alto Ave (ISAVE)

Ao meu marido e ao meu filho pelo apoio, carinho e tolerância às minhas constantes ausências.

## Palavras-chave

Doença cardíaca coronária; óxido nítrico; óxido nítrico sintetase endotelial; polimorfismos da eNOS

## Resumo

A doença cardíaca coronária (DCC) é uma das principais causas de morbilidade e mortalidade nos países desenvolvidos. Na última década um grande número de trabalhos sobre a implicação do óxido nítrico (NO) e DCC foram publicados. O NO é um gás com uma semi-vida de alguns segundos. É sintetizado pela família das óxido nítrico sintetases (NOS), enzimas que produzem NO e L-citrulina a partir da L-arginina. Três distintas isoformas da NOS foram identificadas em humanos. Duas destas isoformas a NOS neuronal (nNOS) e a NOS endotelial (eNOS) são constitutivas e a sua expressão é regulada pelo cálcio-calmodulina. A terceira isoforma é NOS induzível que é regulada pelo estímulo de citocinas.

O NO derivado do endotélio tem um papel crucial na regulação de um vasto leque de funções no sistema cardiovascular, incluindo vassorrelaxamento, inibição da adesão dos leucócitos ao endotélio, proliferação e migração das células lisas do musculo vascular, bem como a agregação plaquetária.

Quando a produção do NO endotelial baixa pode causar disfunção endotelial e acelerar a aterosclerose e a doença arterial coronária.

Vários estudos clínicos genéticos identificaram comuns polimorfismos no gene da eNOS que podem ser associados à aterosclerose e à doença cardíaca coronária. Entre os polimorfismos da eNOS identificados o G894T (Glu298Asp variante) substituição no éxon 7, é a mais frequentemente estudada, mas há controvérsia quanto aos resultados e à sua associação com a DCC, são necessários mais estudos para identificar o polimorfismo genético G894T como factor de risco. Neste trabalho pretendemos analisar a relação do polimorfismo G894T da eNOS com a presença prematura e severidade da doença na população portuguesa. Apresentamos os resultados preliminares obtidos a partir da análise de 54 pacientes com DCC (diagnosticada por cateterismo cardíaco) que foram genotipados para o polimorfismo G894T por PCR-RFLP. Observou-se uma maior proporção do GG homozigotico em pacientes com idade  $\leq$  45 anos. Sendo as frequências dos alelos muito semelhante entre todos os grupos DCC ( $\leq$  45, 45-65 e  $\geq$  65 anos) de acordo com a gravidade, verificou-se que os pacientes TT homozigoticos tem um menor numero de vasos lesados. Mas, para chegar a uma conclusão precisamos analisar mais pacientes e comparar esses resultados com um controlo populacional.

## keywords

Coronary artery disease; nitric oxide; endothelial nitric synthase; eNOS polymorphisms

## Abstract

The coronary artery disease (CAD) is a major cause of morbidity and mortality in developed countries. In the last decade a lot of works about the implication of nitric oxide (NO) in CAD have been published. NO is a gas with a half-life of several seconds. It is synthesized by a family of NO synthase (NOS) enzymes producing NO and citrulline from L-arginine. Three distinct isoforms of NOS have been identified in humans: two of these, neuronal NOS (nNOS) and endothelial NOS (eNOS), are constitutively expressed and are regulated by calcium-calmodulin and by post-translational modifications of the enzymes. The third isoform is inducible NOS (iNOS) and regulated by cytokine stimulation. The endothelium-derived NO plays a crucial role in regulating a wide spectrum of functions in the cardiovascular system, including vasorelaxation, inhibition of leukocyte-endothelial adhesion, vascular smooth muscle cell migration and proliferation, as well as platelet aggregation. Because of that a failure of endothelial NO production can cause endothelial dysfunction and accelerate atherosclerotic coronary artery disease.

Several clinical genetic studies identified different common eNOS gene polymorphisms that might be associated with atherosclerotic coronary artery disease. Among the identified eNOS polymorphisms, the G894T (Glu298Asp variant) substitution within exon 7 is the one most frequently studied, but there are controversial results related to the association with CAD, and we need more studies to identify the G894 polymorphism as a genetic risk factor.

In this work we want to analyse the relationship of eNOS G894T polymorphism with premature presence and severity of CAD in Portuguese population. We present preliminary results obtained from the analysis of 54 patients suffering CAD (diagnosed by cateterism heart), who were genotyped to G894T polymorphism by PCR-RFLP. We have observed a higher proportion of GG homozygous in patients with age  $\leq 45$  years, being the allele frequencies very similar between all CAD groups ( $\leq 45$ , 45-65, and  $\geq 65$  years). According to severity we have found that TT homozygous patients have lesser number of injured vessels. But to get a conclusion we need analyse more patients and compare these results with a control population.

---

## Índice

Introdução-----	2
1-Doenças Cardiovasculares .....	2
1.1- Doença cardíaca coronária .....	3
1.1.1- Factores de risco .....	3
1.2- Formação da placa de ateroma.....	7
1.3- Anatomofisiologia das coronárias e da parede arterial .....	9
1.3.1- Anatomofisiologia da parede arterial.....	9
Figura 2: Anatomofisiologia da parede arterial .....	9
1.3.2- Anatomofisiologia das coronárias .....	11
2- Óxido nítrico.....	13
2.1- Propriedades do óxido nítrico.....	13
2.2- Produção de óxido nítrico .....	14
2.3- Isoformas do óxido nítrico .....	15
2.4- Inibidores das isoformas de NOS.....	17
2.5- Função vasoprotectora do óxido nítrico.....	18
2.6- Polimorfismos.....	21
3- Material e métodos.....	23
4- Resultados .....	25
5 - Discussão.....	29
6 - Bibliografia .....	31
7- Anexos .....	35

---

## Índice Tabelas

<b>Tabela 1 :</b> Nomenclatura da Óxido Nítrico Sintetases (NOSs).....	15
<b>Tabela 2:</b> Diferenças e semelhanças entre as isoenzimas do NO.....	17
<b>Tabela 3 :</b> Características clínicas e demográficas de pacientes diagnosticados com Doença coronária.....	25
<b>Tabela 4:</b> Distribuição genotípica do polimorfismo G894T do gene eNOS em indivíduos com DCC.....	27

---



---

## Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Formação da placa de ateroma.....	8
<b>Figura 2:</b> Anatomofisiologia da parede arterial.....	9
<b>Figura 3:</b> Artérias coronárias.....	12
<b>Figura 4:</b> Síntese de NO.....	15
<b>Figura 5:</b> Isoformas da NOS.....	16
<b>Figura 6:</b> Determinação do polimorfismo G894T do exão 7 do gene eNOS.....	26

---

---

## Índice de quadros

<b>Quadro 1:</b> Genes implicados no risco de aterosclerose.....	4
--	---

**Índice de gráficos**

**Gráfico 1:** Número de vasos lesados determinados segundo o polimorfismo  
genéticoG894T .....28

---

## **Lista de siglas**

**AVC** - Acidente Vascular Cerebral

**DCC** - Doença Cardíaca Coronária

**EDRF** - Factor de Relaxamento Dependente do Endotélio

**HDL-C** - Lipoproteínas de Alta Densidade

**LDL-C** - Lipoproteínas de Baixa-Densidade

**VCAM-1** - Moléculas de Adesão da Célula Vascular

**ICAM** - Moléculas de Adesão Intercelular

**L-NAA** - NG-amino-L arginina

**NHA** - NG-hidroxi-L-arginina

**L-NMMA** - NG-monometil-L-arginina

**L-NA** - NG-nitro- L-arginina

**L-NIO** - N-imino-etil-Lornitina

**NO** - Óxido Nítrico

**NOS** - Óxido nítrico Sintetase

**eNOS** - Óxido Nítrico Sintetase Endotelial

**iNOS** - Óxido Nítrico Sintetase Induzida

**nNOS** - Óxido Nítrico Sintetase Neuronal

**OONO** - Peroxinitrito

**PCRus** - Proteína C Reactiva ultra-sensível

**MCP-1** - Proteínas Quimiotáticas Apresentadas pelos Monócitos

**SNP** - Single Nucleotide Polymorphism

**SOD** - Superóxido Dismutase

**VNTR** - Variable Number of Tandem Repeat

---

---

## **Introdução**

### **1-Doenças Cardiovasculares**

As doenças cardiovasculares são uma das principais causas de mortalidade, invalidez, resultando numa grande perda de produtividade e num aumento dos encargos do sistema de saúde para com estes doentes. Devendo ser encaradas como um dos mais importantes problemas de saúde pública em países industrializados.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (1999), a doença cardiovascular tem vindo a aumentar de uma forma exponencial desde o início do século XX, sendo responsável por menos de 10% das mortes em todo mundo e, no final deste século, aumentou para 50% em países desenvolvidos e 25% nos países em desenvolvimento. (USUF et al, 2001). Dados dos Estados Unidos da América indicam que 50% das mortes ocorrem por doença cardíaca coronária (DCC) e 20% por acidente vascular cerebral (AVC) (III NCEP-NIH, 2002).

Na Europa, a DCC continua a ser a principal causa de morte em homens com mais de 45 anos e em mulheres acima dos 65 anos (EUROASPIRE II, 2001).

No nosso país as doenças cardiovasculares representam a principal causa de morte e são também uma importante causa de incapacidade. Dados do Ministério da Saúde indicam que as doenças cardiovasculares são responsáveis por cerca de 39% dos óbitos em Portugal, sendo que 52% desses óbitos correspondem a doenças cerebrovasculares e 22% à doença isquémica cardíaca. Estes dados são referentes ao ano de 1999 no entanto observa-se uma tendência decrescente a nível nacional em todos os grupos etários, mas ainda é considerada das mais elevadas da Europa e do mundo (Direcção-Geral de Saúde).

Como foi referido anteriormente, das doenças cardiovasculares destacam-se o enfarte do miocárdio, o acidente vascular cerebral, que são frequentemente súbitas e inesperadas, estas devem-se essencialmente à formação de placas de ateroma na parede dos vasos sanguíneos, um fenómeno que tem início numa fase precoce da vida e progride de forma silenciosa ao longo dos

---

anos, e que habitualmente já está avançado no momento em que aparecem as primeiras manifestações clínicas.

### **1.1- Doença cardíaca coronária**

A Doença cardíaca coronária resulta da formação de placas de ateroma na parede dos vasos sanguíneos. É uma doença inflamatória crónica, complexa que actua selectivamente na rede arterial, sendo consequência de uma acção combinada de factores de risco (Ross R, 1999).

Quanto aos factores de risco para o desenvolvimento da DCC, na literatura encontram-se distintas classificações, sendo que uns classificam como Factores de risco genético e Factores de risco ambiental. Outros autores abordam o tema como factores de risco que podem ser modificáveis e não modificáveis, neste tipo de classificação denota-se uma preocupação clínica de profilaxia uma vez que podemos modificar a expressão dos genes recorrendo a fármacos, nos factores ambientais mudando hábitos e estilo de vida, levando desta forma à diminuição do risco de DCC.

#### **1.1.1- Factores de risco**

##### **- Genéticos**

Muitos dos genes já estão identificados como responsáveis pelo desenvolvimento da DCC (Quadro 1), alguns já estão estudados existindo já profilaxia, outros há em que é necessário realizar estudos para entender o seu mecanismo e a interacção. Como há um grande número de genes envolvidos, bem como vários processos bioquímicos na formação e progressão da aterosclerose e como cada um destes processos tem constituintes múltiplos como enzimas receptoras e ligandos, a DCC pode resultar de uma interacção entre vários genes favoráveis e desfavoráveis. É ainda necessário aprofundar estudos sobre a sua interacção afim de encontrar uma profilaxia possível.

---

<b>Metabolismo lipídico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Apolipoproteína (a) [ LP(a) ]</li> <li>• Apolipoproteína B</li> <li>• Apolipoproteína E</li> <li>• Proteína de transferência do colesterol esterificado</li> <li>• Receptor LDL</li> <li>• Lipase lipoprotéica</li> <li>• Paraoxonase</li> </ul>
<b>Regulação da tensão arterial</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Angiotensinogénio</li> <li>• Receptor da angiotensina II, tipo 1</li> <li>• Inibidor da enzima conversora da angiotensina</li> </ul>
<b>Metabolismo da homocisteína</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cistationina beta-sintetase</li> <li>• Metileno tetraidrofolato redutase</li> </ul>
<b>Trombose</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Factor II (protrombina)</li> <li>• Factor V (factor V Leiden)</li> <li>• Factor VII</li> </ul>
<b>Fibrinólise</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fibrinogénio</li> <li>• Inibidor 1 do activador do plasminogénio</li> </ul>
<b>Função plaquetária</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glicoproteína IIIa</li> </ul>
<b>Função endotelial/ resposta inflamatória</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Óxido nítrico sintetase endotelial</li> <li>• Molécula de adesão leucocitária endotelial</li> <li>• Citocinas e metaloproteases</li> </ul>

Quadro 1: Genes implicados no risco de aterosclerose

Um estudo epidemiológico genético analisou 207 pacientes com enfarte do miocárdio antes dos 55 anos e 621 controlos correlacionados com os factores de risco tradicionais. Em uma análise univariada, a razão de chance mais elevada estava associada à história familiar nos parentes de primeiro grau que desenvolveram doença coronária antes dos 55 anos. O risco estava aumentado 7,1 vezes, nos parentes que foram diagnosticados antes dos 65 anos. Este risco é significativamente maior quando comparado com os outros factores de risco como o colesterol acima de 270mg% (razão de chance = 4,3), o tabaco com consumo de pelo menos um maço de cigarros por dia (razão de chance = 4) e o sedentarismo (razão de chance = 3,4).

---

Este estudo sugere ainda que a doença arterial coronária diagnosticada antes dos 55 anos seja devida à contribuição de genes (Edson A. 2002).

Finalmente, vários estudos que investigaram a agregação familiar na doença coronária aterosclerótica demonstraram que, quanto mais cedo é o início desta doença, maior é o risco dos parentes em primeiro grau. Em adição, o risco da doença é muitas vezes maior em parentes de mulheres-caso em comparação com os homens.

Em famílias com doença arterial coronária com início antes dos 46 anos, a hereditariedade é estimada em 90% a 100%, enquanto que em famílias dos casos que adquiriram doença coronária mais tardiamente, o papel da hereditariedade varia entre 15% e 30%.

#### **- Dislipidemia.**

A hipercolesteroliémia e com aumento das lipoproteínas de baixa-densidade (LDL-C) e diminuição das lipoproteínas de alta densidade (HDL-C) é um dos factores que mais predispõe para o desenvolvimento da DCC pois a oxidação do LDL desencadeia o processo de formação das placas de ateroma (Watkins, 2003).

#### **- Hipertensão**

A tensão arterial elevada está correlacionada com o aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, estudos como o HOPE (The Heart Outcomes Prevention Evaluation, 2000) confirmaram os benefícios do tratamento da hipertensão arterial na redução dos riscos e da mortalidade por doença cardiovascular. Entre os motivos associados com a hipertensão e aterosclerose estão a lesão mecânica do endotélio em áreas susceptíveis, disfunção endotelial por stress hemodinâmico e a consequente activação do processo inflamatório, acelerando a aterosclerose (DAI, 2004).



---

### **- Tabagismo**

Dos factores de risco modificáveis o tabaco é o mais importante, este acelera o desenvolvimento da placa aterosclerótica, aumentando a oxidação do LDL-C, e reduzindo os níveis de HDL-C, aumentam ainda os marcadores de inflamação como: Proteína C Reactiva ultrasensível (PCRus), moléculas de adesão intercelular (ICAM), fibrinogénio e possui efeitos adversos sobre a hemostase e agregação plaquetária (Howard et al, 1999).

### **- Diabetes**

Os doentes diabéticos apresentam um aumento da DCC quando comparados com doentes não diabéticos, isto deve-se ao facto da hiperglicemia causar um acumular de subprodutos que estão envolvidos no dano vascular, além disto os pacientes diabéticos desenvolvem um comprometimento da função da musculatura lisa do endotélio, assim como a resistência insulínica que produz um estado pró-trombótico (Zellweger et Pfisterer, 2001).

### **- Obesidade**

Nas sociedades mais desenvolvidas o aumento da obesidade resulta de uma dieta com excesso de calorias e com alto teor de lipídeos, e com a diminuição da actividade física onde se verifica um aumento de sedentarismo.

### **- Idade**

A idade encontra-se entre os factores de risco pois a aterosclerose progride ao longo dos anos, por aumento do tempo de exposição a todos os factores de risco e ainda devido ao processo de degenerescência endotelial (Robbins et al, 1994).

---

## **- Sexo**

O sexo é também um factor de risco uma vez que a DCC tem uma maior percentagem nos homens, sendo que as mulheres até à menopausa estão protegidas pela produção e/ou administração exógena de estrogénios que reduzem o LDL (Robbins et al, 1994).

### **1.2- Formação da placa de ateroma**

A aterosclerose resulta de um espessamento assimétrico da camada íntima das artérias devido à formação de placas de ateroma, estas são compostas de elementos celulares, tecido conjuntivo e lipídeos. Assim a placa aterosclerótica contém tipicamente um núcleo rico em lipídeos, cercado por uma cápsula fibrosa constituída predominantemente por células musculares lisas e proteínas da matriz extracelular. As principais proteínas de matriz na placa são de colagénio tipo I e III, proteoglicanos e elastina, sendo o colagénio 60% do total de proteínas (Katsuda, Kaji, 2003). O conteúdo celular da lesão aterosclerótica contém macrófagos, que entre outros factores expressam um número de enzimas proteolíticas que têm influência na aterogénese e na estabilidade da placa de ateroma ( Katsuda e Kaji, 2003).

O processo que dá início à formação da placa de ateroma é muito complexo e pode ser alterado por inúmeros factores, nomeadamente o óxido nítrico, como veremos mais à frente. De forma geral os estudos indicam que o início da formação da placa de ateroma resulta da oxidação das lipoproteínas, por radicais livres derivados do oxigénio (Steinberg D, 2002). Estes lipídeos oxidados presentes em proteínas de baixa densidade activam a adesão dos monócitos às células endoteliais (Kume N, 2002), favorecendo a entrada destas células para o espaço subendotelial, onde se transformam em macrófagos que captam lipídeos através de receptores de varredura ("scavenger"), cuja expressão depende de factores de transcrição, citocinas e interferon formando

---

as chamadas células espumosas. Em suma a aterosclerose, além de ser ocasionada pela deposição de lipídeos na parede arterial, também é caracterizada por um processo inflamatório de baixo grau. A inflamação está presente em todas as fases do processo de formação da placa de ateroma desde o início da lesão onde há um recrutamento dos leucócitos mononucleares e linfócitos T. No desenvolvimento desta, com libertação de citocinas que fazem com que células inflamatórias entrem no espaço subendotelial e contribuam para a diferenciação de monócitos em macrófagos (estes com receptores para lipoproteínas modificadas) até ao rompimento da placa de ateroma através da quebra da estrutura de colágeno que estabiliza a placa ocasionada pelo interferon-gama e por metaloproteinases levando às complicações trombóticas da aterosclerose (ROSS, 1999 HANSON, 2005).

No decorrer do tempo, a placa aterosclerótica pode aumentar lentamente de tamanho, progredindo para uma grave estenose ou mesmo para uma oclusão arterial total (Figura 1).

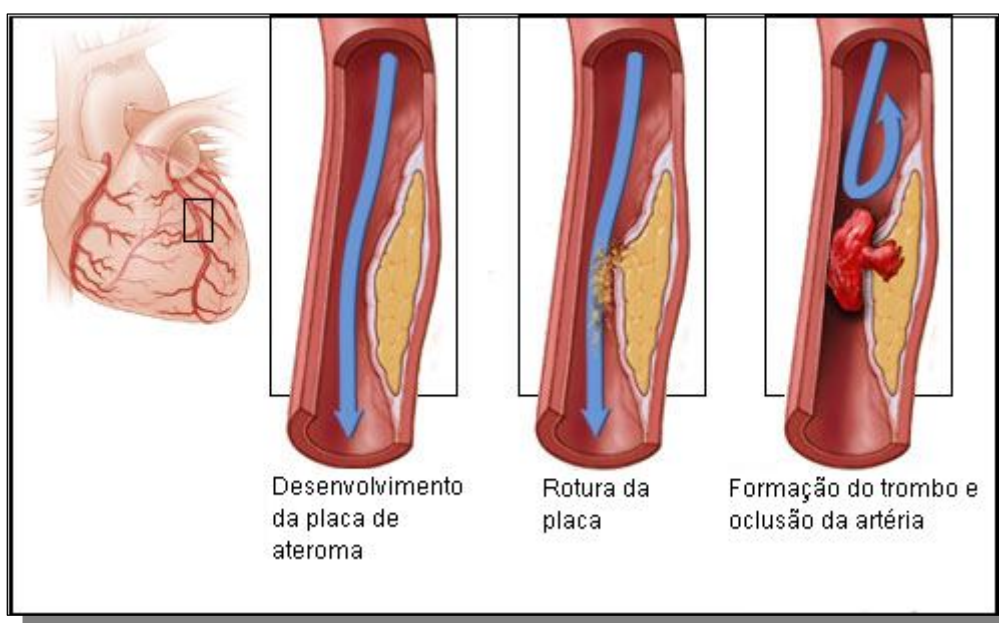


Figura 1: Formação da placa de ateroma

Quanto à estabilidade das placas de ateroma, algumas delas são estáveis, outras há que sendo ricas em lipídeos e células inflamatórias apresentam um risco de fissura espontânea e de

---

ruptura, conseqüentemente ocorre a trombose sobrejacente podendo o trombo formado embolizar e ocluir rapidamente a luz arterial, precipitando para doença coronária aguda (ROSS,1999).

### 1.3- Anatomofisiologia das coronárias e da parede arterial

As doenças cardiovasculares resultam de um processo aterosclerótico que se desenvolve basicamente na parede arterial, levando á perda de elasticidade, formação de placas de ateroma e processos obstrutivos, o que finalmente ocasiona a isquemia das regiões afectadas. É por isso importante conhecer a anatomofisiologia das coronárias e da sua parede arterial para compreender a fisiopatologia destas doenças (Digirolamo M, Schlant R, 1981).

#### 1.3.1- Anatomofisiologia da parede arterial

As paredes arteriais são espessas e compactas o que lhes permite resistir às altas pressões geradas dentro do sistema circulatório, constituídas por três camadas (Túnicas) sobrepostas umas às outras (figura 2).

1. Túnica Intima
2. Túnica Média
3. Túnica Adventícia

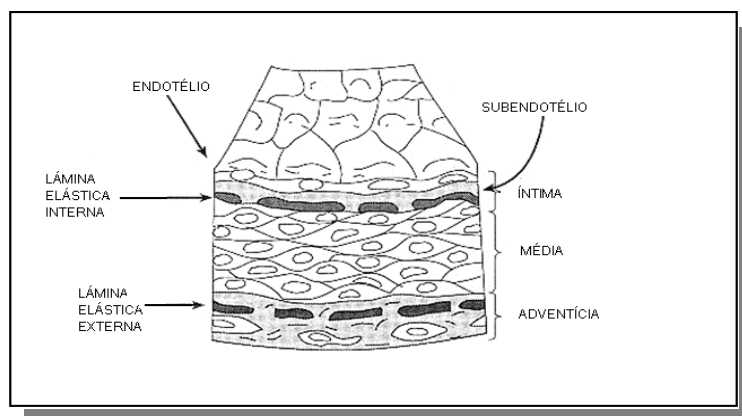


Figura 2: Anatomofisiologia da parede arterial

---

**Túnica Íntima** é constituída pelo endotélio, subendotélio e lâmina elástica interna.

O endotélio nestes últimos anos tem sido alvo de muitos estudos devido à sua importância nas doenças cardiovasculares. O endotélio não é uma camada uniforme, é um tecido especializado que muda a sua morfologia celular segundo a sua localização ou função (Kahleh M,1990) Cada célula endotelial tem as suas próprias características, atributos, configuração, microdomínios, tipos de selectinas, substâncias quimiotáticas, imunoglobulinas e receptores, o que lhe confere um conjunto de funções (Ross R,1990). O subendotélio é constituído por colagénio, microfibrilas e elastina ( Hammerson F,1985).

**A túnica média** é constituída por fibras musculares lisas, orientadas transversalmente, as quais estão rodeadas por colagénio e elastina. Em processos ateroscleróticos as células musculares lisas migram para o subendotélio, fazendo parte das placas de ateroma (Clark JM 1999). Túnica Média ou musculoelástica está limitada por dentro e por fora por lâminas elásticas interna e externa respectivamente. A interna separa a túnica média da íntima e permite um intercâmbio entre componentes da túnica média e subendotélio e vice-versa. A externa separa a túnica média da adventícia.

**A túnica adventícia** é a “capa”, sendo o tubo concêntrico externo das artérias constituído por tecido conjuntivo e por fibras colagénicas e elásticas, onde se encontram os feixes nervosos, os vasos linfáticos e os vasos que nutrem a artéria (“*vasa Vasorum*”). Esta túnica serve de suporte mecânico da artéria quando a túnica média arterial está debilitada pelo processo aterosclerótico (Clark JM,1999).

---

### 1.3.2- Anatomofisiologia das coronárias

Igual aos demais tecidos do corpo, o coração necessita de nutrientes para funcionar e ao contrário do que se possa imaginar, o coração não se nutre de todo o sangue que por ele passa até ser bombeado para as diferentes partes do corpo. Este necessita de duas artérias que possui cuja função delas é irrigar o músculo cardíaco, sendo as denominadas artérias coronárias, que têm origem na porção inicial da *Aorta*, constituindo os primeiros ramos colaterais desta artéria. Estas por sua vez dividem-se em artéria coronária esquerda e artéria coronária direita.

#### - Artéria Coronária Esquerda

O seu tronco de origem mede aproximadamente 1cm e divide-se depois em dois ramos terminais: Artéria Descendente Anterior e a Artéria Auriculo-Ventricular Esquerda ou Ramo Circunflexo.

Artéria Descendente Anterior leva o sangue à parte anterior esquerda do coração.

O ramo circunflexo rodeia o músculo cardíaco e transporta o sangue para a parte posterior esquerda do coração.

#### -Coronária Direita

A *Artéria Coronária Direita* percorre o Sulco Auriculo-Ventricular Direito e o Sulco Interventricular Posterior. Esta divide-se em: artéria descendente posterior direita e artéria marginal direita.

As duas artérias coronárias têm ramos adicionais mais pequenos para levar o sangue a todo o músculo cardíaco, são eles: marginal oblíqua, diagonais, ramo lateral entre outros.

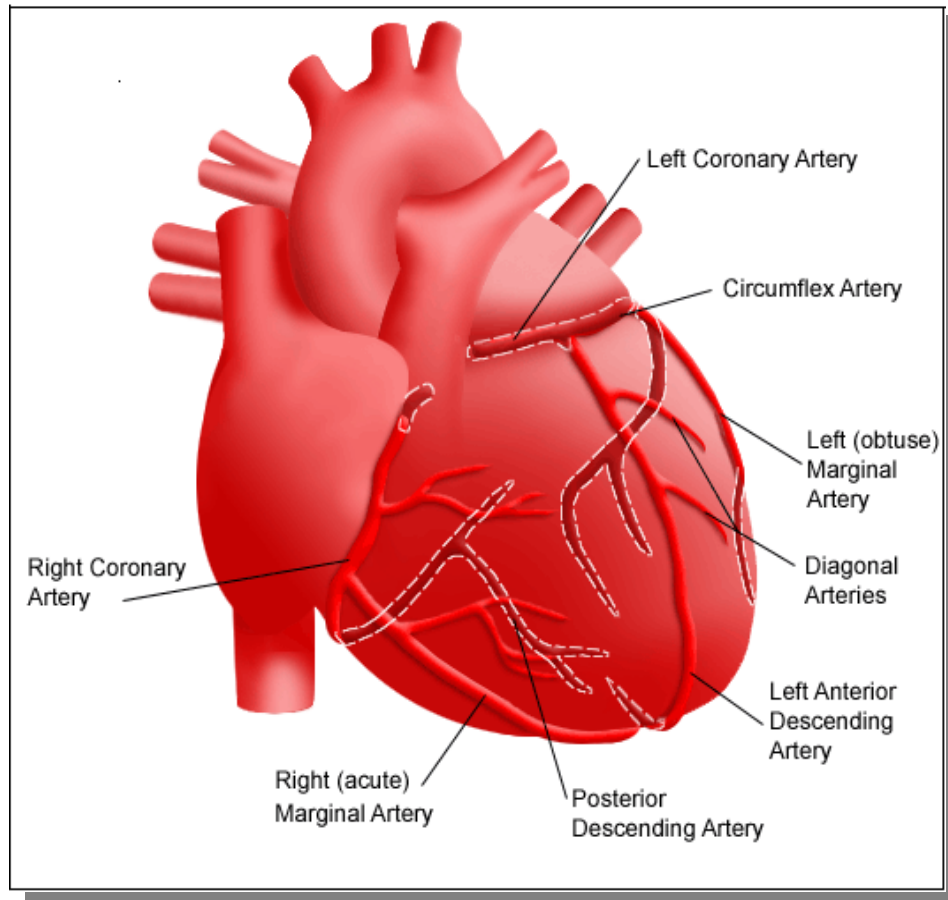


Figura 3: Artérias coronárias

---

## **2- Óxido nítrico**

Em 1980, Furchgott e Zawadzki demonstraram que o relaxamento vascular induzido pela acetilcolina é dependente da presença do endotélio e evidenciaram que este efeito é mediado por um factor humoral lábil, mais tarde conhecido como Factor de Relaxamento Dependente do Endotélio (EDRF).

Em 1988, Furchgott e Ignarro sugeriram simultaneamente que o EDRF e o óxido nítrico eram a mesma molécula (Furchgott, 1988, Ignarro et al, 1998). Esta descoberta de que as células vasculares endoteliais eram capazes de sintetizar óxido nítrico foi recebida inicialmente com cepticismo por uma grande maioria da classe científica.

Porém, actualmente o facto do óxido nítrico se formar a partir do aminoácido arginina pela acção catalizadora da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) já foi comprovado de forma irrefutável. Esta constatação conduziu a um grande desenvolvimento das pesquisas nesta área. Como resultado destas pesquisas foi possível perceber que embora sendo o óxido nítrico uma molécula simples encontra-se envolvida em muitos processos fisiológicos, como neurotransmissão, vasorrelaxamento dependente do endotélio, citotoxicidade mediada por macrófagos, participação na capacidade do sistema imunológico de destruir células tumorais e parasitas intracelulares, inibição da activação, adesão e agregação plaquetária, relaxamento do corpo cavernoso peniano.

Assim uma grande variedade de patologias como doenças cardiovasculares e cerebrais, doenças inflamatórias e infecciosas podem estar relacionadas com uma alta ou baixa concentração de óxido nítrico no organismo. Por todas estas razões em 1992 foi escolhida como a molécula do ano pelos editores da revista Science.

### **2.1- Propriedades do óxido nítrico**

O óxido nítrico (NO) é uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas (Morris SM, Billiar TR, 1994). O NO é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete



---

electrões de nitrogénio e oito de oxigénio, tendo um electrón desemparelhado (Beckman JS, Koppeno, 1996). Este electrão desemparelhado é de grande relevância, uma vez que a maioria das interacções químicas do NO no sistema biológico são caracterizadas pela estabilização do electrão desemparelhado (Kerwin Jr et al, 1995). Esta característica leva-o a reagir rapidamente com outros radicais importantes do ponto de vista biológico, uma das mais importantes reacções do NO é com o O<sub>2</sub>, sendo o peroxinitrito, OONO, o produto dessa reacção (Fukuto JM, Ignarro, 1997), este é um potente oxidante capaz de oxidar tióis e bases de DNA, razão pela qual o NO tem uma actividade citostática ou citocida contra um notável número de microorganismos patogénicos.

A semi-vida do NO varia de 3 a 60 segundos, mas pode ser maior dependendo do ambiente NO e da concentração de O<sub>2</sub> (Davies MG et al, 1995).

## **2.2- Produção de óxido nítrico**

A síntese do NO resulta da acção da óxido nítrico sintetase (NOS) que catalisa a oxidação de um dos dois nitrogénios guanidinos da L-arginina para formar NO e L-citrulina.

A síntese de NO, esquematizada na **Figura 4**, envolve duas etapas. Na primeira, ocorre a hidroxilação de um dos nitrogénios guanidinos da L-arginina para gerar NG-hidroxi-L-arginina (NHA). Esta reacção utiliza NADPH e oxigénio (O<sub>2</sub>) e, provavelmente, envolve o complexo heme da NOS. Na segunda etapa, ocorre a conversão da NHA em NO e citrulina. A Flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e a tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) são utilizados como co-fatores na reacção (Marletta MA, 1994).

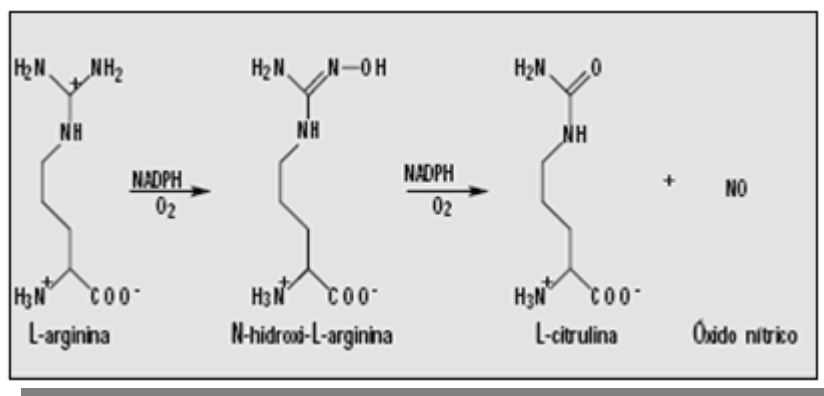


Figura 4: Síntese de NO

### 2.3- Isoformas do óxido nítrico

As três isoformas de óxido nítrico sintetase (NOS) humanas identificadas até agora são: óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS), óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS) e óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) encontradas nos cromossomos humanos 7,12 e 17 respectivamente (Wang Y, Marsden PA 1995).

Ao longo da revisão bibliográfica foram encontradas diferentes nomenclaturas das isoformas das NOSs, que se encontram representadas na (Tabela 1).

Tabela 1: Nomenclatura da Óxido Nítrico Sintetases (NOSs)

NOMENCLATURA DA ÓXIDO NÍTRICO SINTETASES (NOSs)	
ENZIMAS	NOMENCLATURAS
NOS endotelial	eNOS, ecNOS, cNOS, NOS III ou NOS3
NOS neuronal	bNOS(brain), NOS I ou NOS 1
NOS induzida	iNOS, NOS II ou NOS2

---

Estas isoformas da NOS ( figura 5) são agrupadas em duas categorias, a NOS induzível e a NOS constitutiva (c-NOS)

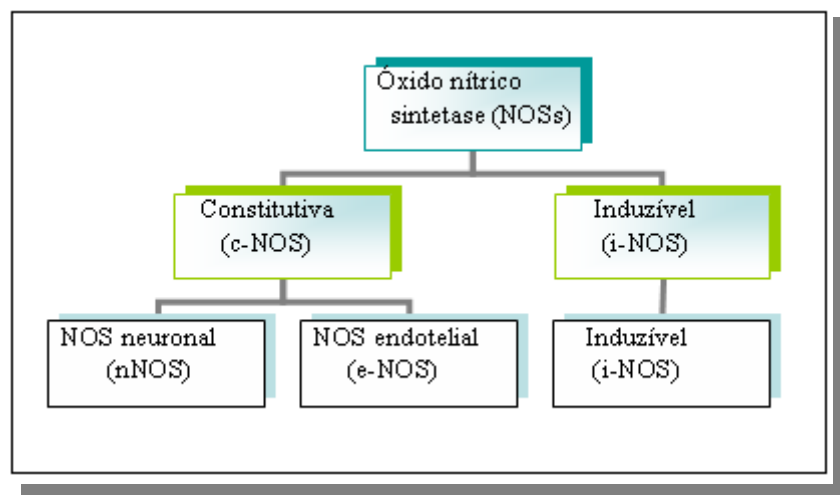


Figura 5: Isoformas da NOS

A isoforma constitutiva compreende a NOS neuronal (n-NOS, tipo I), presente normalmente nos neurónios, e a NOS endotelial (e-NOS), presente normalmente nas células endoteliais vasculares e nas plaquetas (Moncada S et al, 1991).

Quanto à produção de óxido nítrico a c-NOS produz pequenas quantidades, e sua ativação depende dos iões  $\text{Ca}^{2+}$  e de calmodulina, estando também envolvida na sinalização celular (Marletta MA, 1994; Moncada S et al, 1991).

A isoforma induzível (iNOS), não é expressa sob condições normais. É produzida por macrófagos, linfócitos T e muitas outras células, como células endoteliais, células da musculatura lisa vascular, miócitos cardíacos, hepatócitos, plaquetas quando estas são activadas por citocinas como IL1b; TFN- $\alpha$ ; IFN- $\gamma$ ; IL-6 entre outras. Por estas características tem um papel importante e actividades antimicrobianas, antiparasitárias e antineoplásicas (Fukuchi M, 1998) sendo que a sua indução está envolvida na patofisiologia de doenças auto-imunes e no choque séptico. A síntese

---

da iNOS leva 2 a 4 horas para ser expressa e a sua actividade persiste por mais de 24 horas. Esta isoforma é independente do cálcio e produz quantidades muito maiores de NO que a c-NOS . (Adams HR, 1996).

Assim a c-NOS e a i-NOS diferem entre si (Tabela 2) nomeadamente quanto ao peso molecular, à forma de activação e à capacidade de síntese de NO tendo sido já caracterizadas, purificadas.

Tabela 2: Diferenças e semelhanças entre as isoenzimas do NO

	NOS endotelial (eNOS)	NOS neuronal (nNOS)	NOS induzida (iNOS)
Controle primário	Ca 2+ /calmodulina	Ca 2+ /calmodulina	Expressão Génica
Localização na célula	Membrana >citossol	Citossol	Citossol > Membrana
Produção de NO	Baixa (pmolar)	Baixa (pmolar)	Alta (mmolar)

#### 2.4- Inibidores das isoformas de NOS

Todas as isoformas de NOS podem ser inibidas por análogos da arginina N-substituídos, como a NG-monometil-L-arginina (L-NMMA), N-imino-etil-Lornitina (L-NIO), NG-amino-L arginina (L-NAA), NG-nitro- L-arginina (L-NA) e o metil éster correspondente, o NG-nitro-L-arginina-metil-éster (L-Name). Estes análogos competem com a L-arginina e agem como inibidores estereoespecíficos da NOS (Kurose I, 1993). Além destes inibidores, a aminoguanidina é também capaz de inibir a NOS e apresentar uma relativa selectividade para i-NOS (Kurose I, 1993). Vários

---

destes inibidores têm sido utilizados em estudos da função do NO, tanto em células isoladas como *in vivo*.

## **2.5- Função vasoprotectora do óxido nítrico**

Actualmente, está bem estabelecido que o NO resultante da e-NOS tem um papel crucial na protecção do endotélio vascular, assim como dos constituintes que tem um papel importante na formação da placa de ateroma.

### **- Manutenção do tônus vascular**

Para que o tônus vascular seja mantido é necessário que as células endoteliais sintetizem constantemente quantidades ínfimas de NO. Havendo uma discreta vasodilatação quando há um aumento do atrito exercido pelas células circulantes sobre a camada endotelial do vaso (*shear-stress*). Além disso, a pressão sanguínea e o fluxo pulsátil contribuem para regular a liberação de NO em condições fisiológicas (Nava E, Lüscher TF, 1995).

### **- Regulação da pressão sanguínea**

O NO é o principal regulador da pressão sanguínea e este controlo é efectuado a partir da produção de NO nas células endoteliais

Vários mensageiros químicos como a acetilcolina (Ach) estão envolvidos na activação da eNOS através da ligação a receptores apropriados na membrana das células endoteliais. Isto vai provocar a abertura dos canais que permitem que o cálcio penetre na célula, levando a um aumento da concentração de cálcio intracelular, activando a enzima eNOS. O óxido nítrico produzido difunde-se na célula endotelial para a célula muscular onde activa a enzima guanilato ciclase (GC) que vai actuar sobre a guanosina trifosfato (GTP) para formar guanosina monofosfato

---

cíclica (GMPc). O aumento dos níveis de GMPc diminui a quantidade de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) livre na célula muscular causando seu relaxamento (Gewaltig MT, Kojda G, 2002).

#### **-Prevenção da agregação plaquetária**

O NO libertado para a corrente sanguínea pelas células endoteliais pode penetrar nas plaquetas, especialmente nas que se encontram justapostas à parede do vaso ou nas hemácias. No interior das plaquetas, de modo análogo ao discutido para a célula muscular, o NO promove um aumento de GMPc e a consequente diminuição do  $\text{Ca}^{2+}$  livre. Como o  $\text{Ca}^{2+}$  é essencial para o processo de activação plaquetária, esse processo estará inibido. Assim o NO é importante no controle da função plaquetária, pode ser endógeno uma vez que as plaquetas humanas possuem e-NOS e são também produtoras de NO provenientes do endotélio (Gewaltig MT, Kojda G, 2002).

#### **- Inibição da adesão de monócitos ao endotélio vascular**

Uma das condições importantes para o desenvolvimento da arteriosclerose, é o fenómeno de adesão dos monócitos à parede do endotélio vascular. No entanto, este fenómeno somente ocorre na presença de diversos factores, nomeadamente, pela apresentação de moléculas de adesão na superfície endotelial. A manifestação destas moléculas pode ocorrer em caso da célula endotelial estar submetida a stress oxidativo. As moléculas apresentadas pela superfície endotelial são: moléculas de adesão da célula vascular (VCAM-1), moléculas de adesão intercelular (ICAM I), proteínas quimiotáticas apresentadas pelos monócitos (MCP-1), selectinas e citocinas.

A adesão dos monócitos à parede do endotélio vascular, não depende somente da expressão das moléculas de adesão pela superfície endotelial, já que este fenómeno depende dos níveis de óxido nítrico. Ao alcançar determinados valores, o óxido nítrico inibe a expressão das moléculas de adesão pela parede endotelial, impedindo a agregação dos monócitos à parede do vaso (Kubes P et al, 1991).

---

#### **- Efeito antiproliferativo**

O processo de vaso-oclusão é mediado pela camada muscular presente no interior dos vasos sanguíneos. Apresentando esta camada variações, a actividade contráctil característica da mesma pode ser perdida, sofrendo as células um crescimento acentuado e anormal.

Este fenómeno pode dar-se pela estimulação das células musculares, por certos factores de crescimento, tal como na presença do factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF). Mediante estas alterações as células musculares podem atingir a íntima e dessa forma levar ao aumento do volume tecidual do vaso.

Tem sido demonstrado que o óxido nítrico proveniente do endotélio ou de proveniência exógena ao endotélio tem a capacidade de inibir a proliferação das células musculares. Não sendo no entanto ainda claro o mecanismo da actividade antiproliferativa. (Gewaltig MT, Kojda G, 2002)

#### **- Efeito antioxidativo**

O estresse oxidativo do vaso contribui para as doenças tromboembólicas. O NO produzido pela e-NOS induz a produção da enzima superóxido dismutase (SOD) na camada muscular do vaso e extracelular, diminuindo o  $O_2$  disponível e, consequentemente, a produção de ONOO. O NO também induz a síntese de ferritina, que se liga a iões ferro livres e previne a geração de  $O_2$ . Por outro lado, na presença da placa aterosclerótica, os macrófagos activados produzem  $O_2$ , expressam i-NOS sendo que esta isoforma produz quantidades elevadas de NO, este em excesso liga-se ao  $O_2$ , produzindo ONOO e OH, que em grandes quantidades comprometem, ainda mais, a integridade tecidual, favorecendo a activação da coagulação e contribuindo para a obstrução da luz vascular (Wolin MS, 2000).

---

## **2.6- Polimorfismos**

Polimorfismos são variações genéticas quando presentes numa frequência superior a 1% na população. Elas podem ser de vários tipos; deleção/ inserção, SNPs, VNTR, entre outros. No entanto o tipo mais comum, é o SNP (single nucleotide polymorphism) onde uma base é trocada por outra num determinado nucleotídeo do genoma.

Milhões de polimorfismos já foram identificados e catalogados, no entanto apenas alguns deles apresentam consequências funcionais, ou seja acarretam alterações na expressão génica, na síntese e actividade biológica das proteínas que codificam. Estas variações génicas podem alterar funções importantes em várias vias biológicas acarretando maior ou menor susceptibilidade no desenvolvimento de doenças.

### **- Polimorfismos da eNOS**

O gene da eNOS está localizado no cromossoma 7q35-36, contendo 26 exões que ocupam 21 quilobases. Neste gene já foram descritos alguns polimorfismos entre os quais; o polimorfismo T786C localizado na região promotora do gene que causa uma diminuição na expressão da enzima (Zhao Q et al, 2006).

O polimorfismo G894T, presente no éxon 7 do gene do qual resulta a substituição de um aminoácido glutamato por aspartato na posição 298 da enzima (Glu298Asp) (Gemán et al, 2005). Há vários estudos sobre este polimorfismo, no entanto não é conclusivo se a troca destes aminoácidos tem ou não efeitos sobre a actividade da enzima e a sua correlação com a DCC (Gardemann et.al.; Hingorani, et al 1998; Zhao Q et al 2006).

O polimorfismo, Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) do intrão 4, tem um alelo grande comum e um alelo menor. O alelo maior (alelo de eNOS4b), designado b-inserção tem cinco repetições em tandem, e o alelo menor (alelo eNOS4a) tem quatro repetições em tandem. A



---

informação disponível dos diferentes estudos da associação do polimorfismo do intrão 4b/a VNTR do eNOS com DCC é controversa (Salimi S et al, 2006).

---

### 3- Material e métodos

O objectivo deste trabalho de investigação é verificar a incidência dos polimorfismos do óxido nítrico sintetase endotelial e a sua correlação com a doença coronária. No entanto o presente estudo é um estudo preliminar, visto que o número de indivíduos analisados não é suficiente para obter dados estatisticamente significativos, para fazer essa correlação.

Até à presente data foram seleccionados 54 doentes da consulta de coronária do Serviço de Cardiologia do Centro Hospitalar do Alto Ave EPE, aos quais foi feita colheita de sangue periférico em EDTA, e um questionário de consentimento informado (anexo1) onde se inquiria sobre os factores de risco, sendo à posterior esses dados confirmados no processo clínico. Uma vez que se verifica uma grande dificuldade por parte dos doentes em responderem às questões. Nestes processos foram também alvo de consulta, exames como cateterismo cardíaco, angiografia e coronariografia para confirmar a doença coronária e mesmo o número e o grau de vasos lesados.

A todas as amostras de sangue periférico foi feita a extracção de DNA genómico pelo método clássico descrito por Debomoy K. et al, (1991). Este protocolo foi adaptado ao nosso laboratório (anexo 2).

A qualidade e a concentração do DNA foi verificada através de uma electroforese em gel de agarose a 1% com padrão Ladder (New England. Biolabs,U.K) e recorrendo ao uso de espectrofotómetro A260 e A280 respectivamente. A determinação do genótipo do polimorfismo G894T do exão 7 foi executada mediante PCR-RFLP na qual foi amplificado um fragmento de 206 pb a partir de 100ng de DNA genómico, seguidamente o fragmento amplificado foi tratado com a enzima de restrição Mbol (New England. Biolabs,U.K).

Para a PCR usou-se os primers 5'-CATGAGGCTCAGCCCCAGAAC-3' (sense) e 5'-AGTCAATCCCTTTGGTGCTCAC-3' (antisense) sendo as condições utilizadas na PCR 5 minutos de desnaturação a 94°C seguido de 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 61°C durante 30

---

segundos, 72°C durante 30 segundos e finalmente 10 minutos de extensão a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 3%.

#### 4- Resultados

As características clínicas e demográficas dos 54 indivíduos incluídos neste estudo, estão demonstrados na tabela 3. Aproximadamente 75% são homens e/ou apresentam dislipidemia. Cerca de metade dos indivíduos são fumadores e apresentam história familiar de DCC. Nestes indivíduos, também se observa uma alta prevalência de hipertensos, sendo menor a de diabéticos.

Tabela 3 : Características clínicas e demográficas de pacientes diagnosticados com Doença coronária

	Total N = 54	≤ 45 anos N= 11	>45 - < 65 N = 26	≥ 65 anos N = 17
<b>Idade Diagnóstico (X ± S.D.)</b>	58,4 ± 12	41,1 ± 4,6	57,9 ± 5,2	71,4 ± 5,6
<b>Homens (%)</b>	75,9	100	77,8	52,9
<b>Fumadores (%)</b>	51,8	90,1	38,5	17,6
<b>Hipertensão (%)</b>	66,7	54	69,2	64,7
<b>Diabetes (%)</b>	31,5	9	50	23,5
<b>Dislipidemia (%)</b>	77,8	63	96,1	64,7
<b>História Familiar</b>				
<b>Sim (%)</b>	48	81	46	23,5
<b>Não se conhece (%)</b>	36,5	0	30,8	58,8

Se analisar-mos estes mesmos dados agrupando os indivíduos com base na sua idade em: menor ou igual a 45 anos; entre 45 e 65 anos e superior a 65 anos (tabela 3) estes valores vão ser diferentes. Principalmente a percentagem de indivíduos homens, fumadores e com história familiar de DCC, os quais aumentam de forma inversamente proporcional à idade. No que respeita

---

à diabetes, é um factor que se comporta de forma irregular, enquanto a percentagem de indivíduos com DCC e com diabetes é menor nos grupos com idades inferiores a 45 anos e superiores a 65 anos, sendo de 50% no grupo com idades entre 45 e 65 anos.

É necessário indicar que devido ao número de indivíduos analisados em cada grupo que é de momento pequeno (n= 11 para  $\leq 45$  anos; n= 26 para o grupo de 45 a 65 anos e n= 17 para os o grupo  $\geq 65$  anos) não nos pareceu oportuno realizar testes estatísticos, para determinar se as diferenças encontradas são significativas, limitando-nos até ao momento a realizar um estudo descritivo.

Para a determinação do genótipo do polimorfismo G894T do gene da eNOs levou-se a cabo uma PCR onde se amplificou um fragmento de 206 pares de bases (figura 6a). Posteriormente este produto foi tratado com a enzima de restrição MboI obtendo-se um fragmento de 206 pb para os homozigóticos GG, três fragmentos para os heterozigóticos GT (206pb, 119pb, 87pb) e para os homozigóticos TT de 119 e 87 pares de bases (figura 6b).

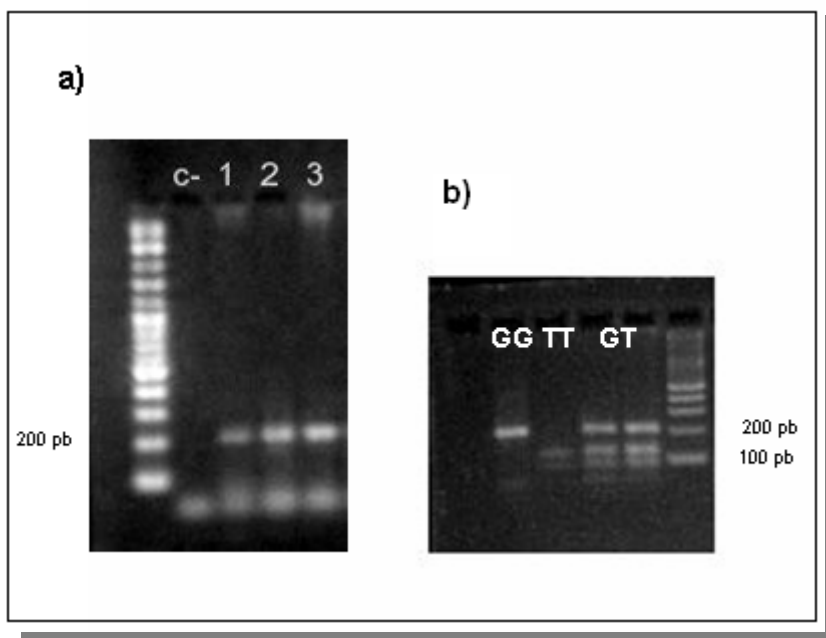


Figura 6: Determinação do polimorfismo G894T do exão 7 do gene eNOS

a)-Produto de PCR de 206pb

b)-Resultado obtido após o tratamento com enzima MboI e genótipo correspondente

Na tabela 4 mostra-se a distribuição genotípica do polimorfismo G894T do gene eNOS e as frequências alélicas obtidas no total da amostra assim como os diferentes grupos, classificados anteriormente pelas idades. Em todos os casos as frequências genotípicas e alélicas são compatíveis com o equilíbrio Hardy-Weiberg, aceitando o modelo de herança recessiva para o alelo T. A proporção de homozigóticos para T (TT) é muito semelhante em todos os grupos, excepto nos indivíduos com idades compreendidas entre 45 e 65 anos que é menor aproximadamente uns 8%. No que respeita aos outros polimorfismos GG e GT as percentagens também são muito semelhantes entre os distintos grupos, observando-se um aumento da proporção GG e uma diminuição de GT nos pacientes com menos de 45 anos. No que se refere à frequência dos alelos G/T não mostram grandes discrepâncias.

Tabela 4: Distribuição genotípica do polimorfismo G894T do gene eNOS em indivíduos com DCC.

	Total N = 54	≤ 45 anos N= 11	>45 - < 65 N = 26	≥ 65 anos N = 17
<b>eNOS (G894T)</b>				
<b>GG (%)</b>	37	55	35	29
<b>GT (%)</b>	50	27	57	53
<b>TT (%)</b>	13	18	8	18
<b>Alelos</b>				
<b>G (%)</b>	62	68	63	56
<b>T (%)</b>	38	32	37	44

Analisou-se também, se existe alguma relação entre o polimorfismo genético G894T e o número de vasos lesados. Para isso recorreu-se à consulta de exames como: cateterismo

---

cardíaco, angiografia e coronáriografia cedidos pelo Serviço de Cardiologia do Centro Hospitalar do Alto Ave EPE. Como se mostra no gráfico 1, em que representamos a percentagem de indivíduos com 1 ou 2 vasos lesados e com mais de 2 vasos em relação à presença do polimorfismo GG, GT, TT. O número de vasos lesados tende a ser menor em indivíduos TT.

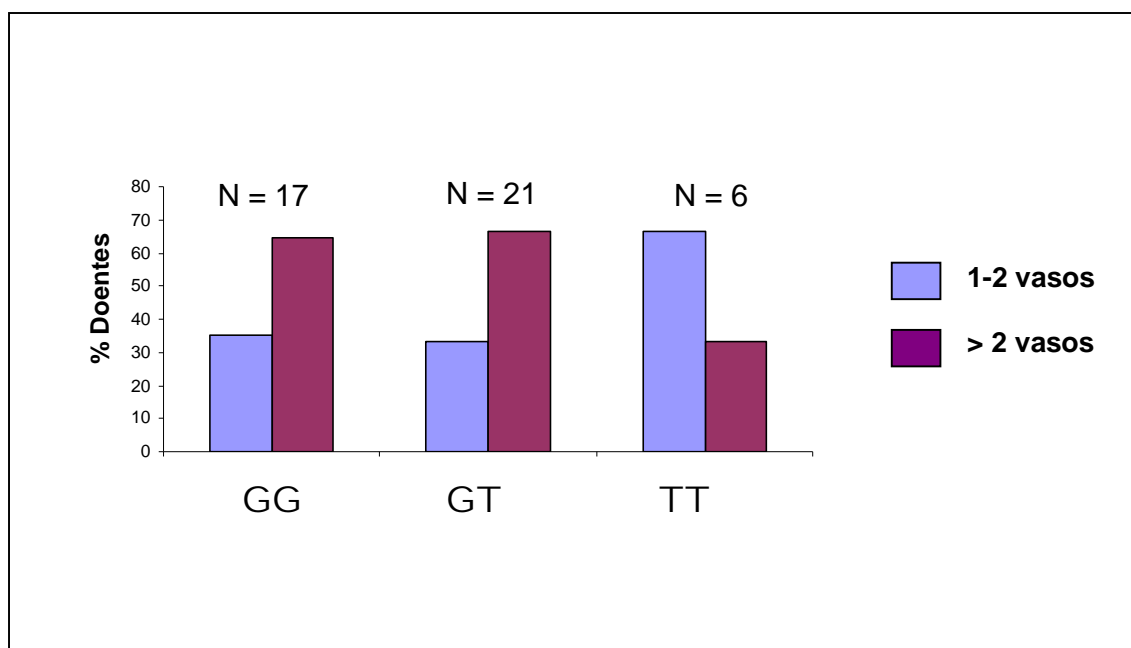


Gráfico 1: Número de vasos lesados determinados segundo o polimorfismo genético G894T.

---

## 5 - Discussão

O NO é uma molécula chave na funcionalidade do endotélio e tem vários efeitos anti-ateroscleróticos, tais como: a inibição da adesão leucocitária, diminui a interacção do vaso com as plaquetas, inibe a proliferação e migração das células do músculo liso dos vasos (Joel E, et al 2004; Gewaltig MT, Kojda G, 2002). Assim, já na passada década foi considerado que defeitos na síntese do NO pode predispor ao desenvolvimento de placas de ateroma, e que o gene eNOS poderia ser um gene ligado à susceptibilidade de sofrer aterosclerose (Nava E, 1995; Kurose, 1993).

Nos últimos anos, devido à dificuldade técnica para a medição directa do NO *in vivo*, desenvolveram-se estudos epidemiológicos tipo caso-controlo para relacionar o genótipo com os níveis de expressão da enzima eNOS, e o desenvolvimento de placas de ateroma. No entanto, depois de uma grande pesquisa bibliográfica, não foram encontrados dados relativos a estudos feitos na população portuguesa, assim sendo, este seria o primeiro estudo que tenta avaliar a relação de polimorfismos genéticos da eNOS com o desenvolvimento prematuro de Doença Arterial Coronária no Norte de Portugal.

Um dos maiores problemas na realização de estudos epidemiológicos é a procura de um bom "grupo controlo", assim na bibliografia consultada o grupo controlo utilizado para comparar com os doentes que sofrem DCC, é constituído por indivíduos da mesma idade, sexo e peso, que não apresentam factores de risco tais como: hipertensão, dislipidémia, diabetes. Mais, em nenhum caso avaliam directamente a presença de vasos lesados mediante cateterismo / angiografia ou a possível formação futura, o que seria o totalmente correcto, embora seja eticamente questionável. Daí que o nosso trabalho não pretenda determinar diferenças genéticas entre indivíduos doentes e saudáveis, mas sim, poder avaliar num futuro próximo, diferenças entre indivíduos que desenvolvem placas de ateroma e posterior enfarte de maneira prematura (com idade inferior aos 45 anos), com aqueles que o fazem em idade avançada. Neste último grupo, a formação do



---

ateroma é devida, com muita mais probabilidade, à própria degenerescência endotelial e não deve ter uma grande influência genética (Kimberly et al, 2003).

As diferenças encontradas na percentagem de indivíduos homens e/ou fumadores com menos de 45 anos e maiores de 65, indicam que estes factos são condições importantes no desenvolvimento prematuro de DCC na população do Norte de Portugal, o que coincide com o descrito noutros estudos (Salimi S. et al, 2006). No entanto, nesta amostra populacional a diabetes não parece ser uma característica clínica dos pacientes jovens.

Relativamente à possível associação do polimorfismo G894T do gene eNOS com DCC prematuras, mesmo não se realizando análise estatística devido ao tamanho da amostra, os nossos dados parecem indicar uma maior presença do genótipo GG (55%) em pacientes jovens (menos de 45 anos) com respeito aos mais velhos (29% dos indivíduos maiores que 65 anos apresentam o polimorfismo GG), o que coincide com os resultados obtidos por grupos holandeses (Agema W.R. 2004), mas discrepantes com dados obtidos por outros grupos europeus (Gardemann et. al, 2002.; Hingorani, et al, 1998) em que o genótipo TT está intimamente ligado à DCC prematura.

Estas discrepâncias podem ter diferentes explicações, como o background étnico, o impacto da interacção com o ambiente e certos hábitos de vida, como fumar, e sem dúvidas não podemos esquecer o possível efeito do azar. Sendo necessário a realização de mais estudos, com um maior número de indivíduos e tentando incluir indivíduos do sexo feminino com menos de 55 anos, no grupo etário em que o desenvolvimento da DCC é precoce, já que os estudos apontam a que os estrogénios protegem da aterosclerose, pelo que as mulheres que ainda não entraram na menopausa ficam protegidas, podendo ser considerando “prematuro” o desenvolvimento da DCC antes da menopausa (Maturana MA et al, 2007)

---

## 6 - Bibliografia

- Actualização do Programa Nacional de Prevenção e Controlo da Doenças Cardiovasculares, Ministério da Saúde. Direcção-Geral da Saúde, circular Normativa N°03/DSPCS, de 06/02/2006.
- Adams, H.R. Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. *J Am Med Assoc* 1996; 209:1297-302.
- Beckman, J.S. & Koppenol, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.*, 271: C1424-37, 1996.
- Clark, J.M. And Glavo, S : Structural integration of the arterial Wall.J. Relation ships and attachments of medial smooth cells in normally distended and hyperdistended aortas *Lab.Inves.*1999.40: 587.
- Dai, G., Kaazempur-Mofrad, M.R., Natarajan, S., Zhang, Y. e Vaughn, S., Blackman, B.R.
- Davies, M.G., Fulton, G.J., Hagen, P.O. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg*, 1995; 82:1598-610.
- Debomoy, K., Lahiri and John I, Nurnberger, J.R. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*, vol 19: 5444, 1991.
- Digirolamo, M., Schlant, R. Hurst. 2ª Edition .Ed. Toray.1981.
- EUROASPIRE II Study Group. Lifestyle and risk factor management and use of drug therapies in coronary patients from 15 countries. *Eur Heart J* 2001; 22:554-572.
- Fukuchi, M., Hussain, S. N., Giaid A - Heterogeneous expression and activity of endothelial and inducible nitric oxide synthases in end-stage human heart failure. *Circulation* 1998; 98: 132-9.
- Fukuto, J. M. e Ignarro, L. J. *Acc. Chem. Res.* 1997, 30, 149.

- 
- Furchgott, R. F. Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and Endotelium pp 401- 414, Raven Press, New York 1988.
  - Germán, I. Y., Alexandre, C., Zago, Waldomiro, C., Manfroi e Alcides, J. Zago O Polimorfismo 894G>T do gene da óxido nítrico sintase Endotelial e sua associação com doença coronária. HCPA, 25 (3):25-28, 2005.
  - Gewaltig, M.T., Kojda, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potencial. Cardiovasc. Research, 55: 250-60, 2002.
  - Hammerson, F., Hammerson, E. Some structural funcional aspects of endothelial cell. Basic Res Cardiol 1985 :80:491; 49: 677-693.
  - Hansson, G.K. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. N Engl J Med 2005; 352:1685-1695.
  - Howard, G., Wagenknecht, L.E., Burke, G.L., Diez-Roux, A., Evans, G.W., McGovern, P., Nieto, F.J. e Tell, G.S. Cigarette smoking and progression of atherosclerosis: The atherosclerosis risk in communities(ARIC) study JAMA1999; 279:119-124.
  - Ignarro, L. J., Byrns, R. E. e Wood, K. S. Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and Endotelium pp 427- 436, Raven Press, New York 1988.
  - Joel E, Edith Tzend. Nitric oxide and arterial disease. Pittsburgh,Pa:187-93, 2004
  - Kahleh, M.B. The role of vascular endothelium in the pathogenesis of connective tissue disease Endothelial injury,activation, participation and response. Clin.Exp.Rheumatol 1990 ; 8: 595-601.
  - Kamm, R.D. García-Cardena G, Gimbrone MA Jr. Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 14871-14876.
  - Katsuda, S., Kaji, T. Atherosclerosis and Extracellular matrix. J Atheroscler Tromb. 10:275-82,2003.
  - Kerwin, Jr.; J. F; Lancaster Jr.; J. R.; Feldman, P. L.; J. Med. Chem. 1995, 38, 4343.

- 
- Kimberly, E., Foreman, Jun T. Molecular mechanisms of replicative senescence in endothelial cells. *Experimental gerontology* 38:1251-57, 2003).
  - Kubes, P. et al. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 4651-5, 1991.
  - Kume N, Kita T. New scavenger receptors and their functions in atherogenesis. *Curr Atheroscler Rep.* 4(4):253-7, 2002
  - Kurose, I., Kubes, P., Wolf, R., Anderson, D.C., Paulson, J., Muyasaka, M. e Granger, D.N. Inhibition of nitric oxide production: mechanisms of vascular albumin leakage. *Circ Res*, 1993; 73:164-71.
  - Marletta, M.A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, 78: 927-30, 1994.
  - Maturana MA, Irigoyen MC, Spritzer PM. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. *Clinics*. 62(1):77-86. 2007
  - Moncada, S. et al. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Reviews*, 43(2): 109-42, 1991.
  - Morris, S.M, Billiar, T.R. New insights into regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am. J. Physiol.*, 266: E829-39, 1994.
  - Nava, E., Lüscher, T.F. Endothelium-derived vasoactive factors in hypertension: nitric oxide and endothelin. *J. Hypert.*, 13 (suppl. 2): S39-48, 1995.
  - NCEP Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), Final Report, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute, NIH Publication 2002 No. 02-5215.
  - Robbins, S.L., Cotran, R. e Kumar, V. *Pathologic basic of disease*. Ed. W.B. Saunders, 1994.

- 
- Ross, R. Atherosclerosis and inflammatory disease. *N Engl J Med.* 340: 115-26,1999
  - Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for 1990s. *Nature* 1955,362 : 881-889.
  - Saeedeh, S., Mohsen, F., Issa, N., Mohammad, S. e Ahmad, M. Endothelial nitric oxide synthase gene intron4 VNTR polymorphism in patients with coronary artery disease in Iran. *Indian J Med Res* 124:638-88, 2006.
  - Steinberg D, Witztum JL. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis. *Circulation.* 30;105(17):2107-11, 2002
  - Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C. e Witztum, J.L. (1989), Beyond cholesterol. Modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *New Engl, J Med* 320: 915-924.
  - Wang, Y., Marsden, P.A. Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. *Adv Pharmacol* 1995; 34: 71-90.
  - Watkins, P.J. Cardiovascular diseases, hypertension, and lipids. *BMJ.* 326:874-6, 2003.
  - Wolin, M.S. Interactions of oxidants with vascular signalling systems. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 20:1430-42, 2000.
  - Yusuf, S., Reddy, S., Ounpuu, S. e Anand, S. Global burden of cardiovascular diseases:PartI: General considerations, the epidemiological transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation* 2001, 104:2746-2753.
  - Zellweger, M.F., Pfisterer, M.E. Silent coronary disease in patients with diabetes mellitus. *swiss Med WKLY.*131:427-432, 2001.
  - Zhao Qi, Su Shao-yong, Chen Shu-feng, Li Biao e Dong-feng. Association study of the endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with essential hypertension in northern Han Chinese. *Chinese Medical Journal.*119(13):1065-71, 2006

---

## 7- Anexos

Nº processo
-------------

Data
------

NºAmostra
-----------

Sexo
Fem
Masc

Idade
-------

Peso
------

Altura
--------

Hipertensão
Sim
Não

Diabetes
Sim
Não

Dislipidemia
Sim
Não

Exercício físico
Sim
Não

Fumador	Anos
Sim	
Não	
Nunca	

História familiar
Sim
Não
Desconhece

Idade
Diag da doença
Anos
Desconhece

Menopausa	trat hormonal
Sim	
Não	

Gravidade da doença

Cirurgia/ Angiopastia

Medicação

Obs

Tomei conhecimento do estudo e aceito participar
--

## **Método rápido não enzimático para preparação de DNA de alto peso molecular em sangue para estudos de RFLP.**

### **Procedimento:**

- 1- Colher uma amostra de sangue para um tubo contendo 100 µl de EDTA a 15%.
- 2- Transferir 2,5-3 ml de sangue para um tubo de 15 ml e, adicionar 5 ml de tampão de baixa concentração em sais contendo 10 mM de Tris-HCL (pH = 7.6), 10 mM de KCL, 10 mM de MgCL<sub>2</sub> e 2 mM de EDTA (TKM 1).
- 3- Adicionar 125 µl de Triton X-100 para lisar as células.  
Homogeneizar bem por inversão.
- 4- Centrifugar a 2200 RPM durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 5- Com cuidado, rejeitar o sobrenadante. Lavar o pellet com 5 ml de tampão TKM 1 e levar a centrifugar nas mesmas condições do passo anterior.
- 6- Resuspender o pellet em 0,3 ml de tampão de alta concentração em sais, contendo 10 mM de Tris-HCL (pH = 7,6), 10 mM de KCL, 10 mM de MgCL<sub>2</sub>, 0,4 M de NaCL e 2 mM de EDTA (TKM2).
- 7- Adicionar 40 µl de SDS a 10% e misturar muito bem a amostra com apoio de uma pipeta (aspirando e rejeitando a amostra várias vezes) e levar a amostra a incubar durante 10-15 minutos a 56°C.
- 8- Adicionar 0,15 ml de NaCL 6 M e misturar muito bem.
- 9- Levar a amostra a centrifugar durante 5 minutos a 12000 RPM, numa microcentrífuga.
- 10- Guardar 400µl sobrenadante (que contém o DNA) e rejeitar o precipitado.



- 11- Adicionar ao sobrenadante 1/10 de Acetato de Sódio 3M (18,46g + 40 ml H<sub>2</sub>O, ajustar o pH com Ácido acético, 8-10 ml e completar com H<sub>2</sub>O até 75 ml). Adicionar ainda, 800 µl de etanol a 100% (-20°C). Inverter o tubo várias vezes (com cuidado, pois uma mistura muito vigorosa da amostra pode levar ao rompimento da cadeia de DNA) até o DNA precipitar. Levar a centrifugar 15 minutos a 13000 RPM.
- 12- Remover o sobrenadante e adicionar 1 ml de etanol 70% a -20°C.
- 13- Centrifugar durante 5 minutos a 13000 RPM a 4°C. Retirar todo o sobrenadante com apoio de uma micropipeta de 1000 µl. De seguida, levar a amostra a centrifugar somente até atingir as 13000 RPM, e retirar o resto de sobrenadante que ficou, com apoio de uma micropipeta de 200 µl.
- 14- Deixar secar **"totalmente"** o pellet a temperatura ambiente (30 minutos, ou toda a noite) e resuspending o DNA em aproximadamente 100 µl de Tris-HCL 10 mM, 1 mM EDTA (pH = 8,0) a 65°C durante 15 minutos (ou toda a noite à temperatura ambiente).
- 15- Medir a concentração de DNA através do espectrofotómetro (A<sub>260</sub> e A<sub>280</sub>), e verifique a qualidade do DNA através da execução de uma electroforese em gel de agarose. TAE (40mM Tris; 5mM acetato de Sódio; 1mM EDTA) + 1% agarose)